

# Srdeční troponiny: současné údaje o diagnostické hodnotě a analytických charakteristikách nových metod detekce

(Cardiac troponins: current data on the diagnostic value and analytical characteristics of new determination methods)

Aleksey M. Chaulin<sup>a,b</sup>, Dmitry V. Duplyakov<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> „Samarská regionální klinická kardiologická léčebna“, Státní rozpočtový ústav zdravotní péče, Samara, Rusko

<sup>b</sup> „Samarská státní lékařská univerzita“, Federální státní rozpočtová vzdělávací instituce Ministerstva zdravotnictví Ruska, Samara, Rusko

## INFORMACE O ČLÁNKU

### Historie článku:

Vložen do systému: 19. 1. 2021

Přepřevzat: 26. 3. 2021

Přiját: 29. 3. 2021

Dostupný online: 9. 8. 2021

### Klíčová slova:

99. percentil

Cirkadiánní zvláštnosti

Genderové charakteristiky

Hraniční hodnota

Infarkt myokardu

Kardiovaskulární onemocnění

Kvantifikační limit

Limit detekce

Srdeční troponiny

Variační koeficient

Vysoce citlivé detekční metody

### Keywords:

99th percentil

Circadian features

Cardiac troponins

Cardiovascular diseases

Coefficient of variation

Cut-off level

Gender characteristics

Highly sensitive detection methods

Limit of detection

Limit of quantitation

Myocardial infarction

## SOUHRN

Vysoká úroveň prevalence, morbidity a mortality populace na kardiovaskulární onemocnění (KVO) podněcuje výzkumné pracovníky k dalšímu výzkumu s cílem najít nové biomarkery a zlepšit metody detekce starých biomarkerů za účelem optimalizace včasné diagnostiky KVO. Relativně nedávno byly do klinické praxe zavedeny nové vysoce a ultrasenzitivní metody detekce srdečních troponinů, jejichž klíčovou výhodou je schopnost včasného optimálního rozhodování o volbě další taktiky pro léčbu pacientů přijatých na pohotovost s bolestí na hrudi. V současné době bylo vyvinuto značné množství vysoce citlivých metod pro detekci srdečních troponinů, které se významně liší svými kvalitativními charakteristikami. Tento článek shrnuje aktuální informace o biologické a diagnostické hodnotě srdečních troponinů, analytické vlastnosti vysoce citlivých metod detekce srdečních troponinů.

© 2021, ČKS.

## ABSTRACT

The high levels of prevalence, morbidity, and mortality from cardiovascular diseases (CVDs) encourage researchers to conduct further research to find new biomarkers and improve methods of determining old biomarkers to optimize early diagnosis of CVDs. Relatively recently, new highly and ultrasensitive methods of cardiac troponin determination have been introduced into clinical practice, where the key advantage is the possibility of making an early optimal decision on the choice of further management tactics for patients admitted to the emergency department with chest pain. Currently, a considerable number of highly sensitive methods for determining cardiac troponins have been developed, which significantly differ in their qualitative characteristics. This article summarizes current information on the biology and diagnostic value of cardiac troponins and the analytical characteristics of highly sensitive determination methods.

## Úvod

Komplex troponinů lidské příčně pružované svaloviny srdce se skládá ze tří troponinových proteinů (cTnI, cTnT a cTnC), které normálně regulují procesy optimální

kontrakce a relaxace myokardu.<sup>1</sup> Struktura (složení aminokyselin) proteinů troponinu v myokardu určuje fungování celého myokardu. Bylo nalezeno velké množství menších mutací (podle typu substituce nebo delece jednoho nebo několika nukleotidů), které nicméně způsobují vý-

**Adresa pro korespondenci:** Aleksey M. Chaulin, MD, „Samarská regionální klinická kardiologická léčebna“, Státní rozpočtový ústav zdravotní péče, Samara, Rusko, e-mail: alekseymichailovich22976@gmail.com

DOI: 10.33678/cor.2021.041

znamnou dysfunkci myokardu a jsou odpovědné za rozvoj kardiomyopatií.<sup>2</sup> Aminokyselinové složení dvou ze tří proteinů myokardu troponinu (cTnI, cTnT) se liší od struktury troponinů v kosterní příčně pruhované svalovině, zatímco aminokyselinové složení podjednotky vázající vápník (troponin C) je podobné jako v kosterních svaích. Kardiospecifické troponiny (cTnI, cTnT) jsou lokalizovány hlavně v myokardu, ale současně existují důkazy o expresi troponinu v příčně pruhované svalové tkáni, stejně jako ve stěně dutých a plicních žil.<sup>1,3-7</sup> Z tohoto důvodu je stále nelze považovat za absolutní kardiospecifické biomarkery.

Obsah cTnI v lidském myokardu činí 4–6 mg na 1 g hmotnosti vlhké tkáně a obsah cTnT je přibližně dvakrát větší, a to 10–11 mg na 1 g hmotnosti vlhké tkáně. Většina troponinů (asi 95 %) se nachází ve složení komplexu troponin-tropomyosin (kontraktilní aparát) a reguluje kontraktilní funkci, zatímco asi 5 % troponinových proteinů je volně umístěno v cytosolu kardiomyocytů a neúčastní se kontraktilní funkce myokardu.<sup>8-10</sup>

K dnešnímu dni srdeční troponiny (cTnI a cTnT) nadále zůstávají nejžádanějšími biomarkery pro diagnostiku akutního infarktu myokardu (AIM), mají však řadu nevýhod: relativně dlouhá doba na zjištění skutečnosti zániku kardiomyocytů, nedostatečná specifita pro ischemickou nekrózu kardiomyocytů. Proto lze cTnI a cTnT považovat za specifické biomarkery poškození buněk myokardu, ale nelze je považovat za specifické biomarkery AIM a při stanovení této diagnózy se spoléhat pouze na výsledky laboratorních studií. Zvýšení hodnoty troponinů v časných stádiích patologických procesů (AIM, myokarditida atd.) také neumožňuje rozlišovat nevratné poškození od reverzibilního, protože koncentrace troponinů v raných stádiích je nízká a může souviset s jejich cytosolickou frakcí. Kardiomyocyty mohou být poškozeny v mnoha fyziologických (fyzická aktivita, psychoemoční stres) a patologických stavech (myokarditida, seps, selhání ledvin, chemoterapie nádorových onemocnění atd.), které nejsou spojeny s AIM, což na jedné straně poskytuje další diagnostické příležitosti, na druhé straně mohou tyto stavy komplikovat diferenciální diagnostiku AIM.<sup>11-14</sup> Mechanismy poškození kardiomyocytů a následné zvýšení koncentrace troponinů za těchto stavů nebyly s konečnou platností stanoveny, dynamika (kinetika) koncentrace je obvykle nespecifická a může být podobná kinetice při AIM. Je velmi pravděpodobné, že mechanismy poškození jsou množstevní a mají složitou povahu. Například u sepsy byl zaznamenán jak přímý škodlivý účinek zánětlivých cytokinů, tak zvýšení poptávky kyslíku v myokardu, což je nějakým způsobem podobné mechanismům vývoje infarktu myokardu 2. typu. Při selhání ledvin je odpovědným mechanismem růstu troponinů v séru podle některých údajů pokles rychlosti glomerulární filtrace,<sup>15,16</sup> a podle jiných – přímý škodlivý účinek akumulovaných toxických metabolických produktů a aktivace exprese srdečních troponinů v kosterních svaích.<sup>4,17</sup> Za fyziologických podmínek, například při dlouhodobé námaze, psychoemočním stresu nebo přechodných epizodách ischemie, je poškození kardiomyocytů obvykle reverzibilní a hodnota troponinů v séru se zvyšuje v důsledku uvolňování troponinů, které se v kardiomyocytu volně nacházejí. Současně při velmi těžkém a dlouhodobém zatížení, na-

příklad při běhu na maratonskou vzdálenost, se hodnota troponinů zvyšuje desetinásobně, což může naznačovat nevratné poškození (destrukce a uvolňování troponinů z kontraktilního aparátu) a zánik kardiomyocytů.

Vývoj a implementace vysoce citlivých metod identifikace troponinů (hs-cTnI a hs-cTnT) významně rozšířily diagnostické možnosti a vyhlídky na použití těchto biomarkerů.<sup>11,12</sup> Zpravidla se za nepříznivý prognostický znak považuje přebytek koncentrací hs-cTnI a hs-cTnT > 99. percentil – koncentrace troponinů, která je detekována u 99 % skutečně zdravých jedinců, a zvýšený výsledek je povolen pouze u 1 % skutečně zdravých vyšetřovaných osob. Pomocí vysoce citlivých metod bylo zjištěno, že koncentrace troponinů závisí na biologických charakteristikách: pohlaví, věku a cirkadiálních rytmech.<sup>18,19</sup> Hodnota kardiospecifických troponinů u mužů je tedy vyšší než u žen, což je doporučeno pro stanovení hodnot 99. percentilu používaných v moderních diagnostických algoritmech pro diagnostiku AIM.<sup>20</sup> Vyšší hodnota srdečních troponinů u mužů je vysvětlena skutečností, že hmotnost levé komory je u nich větší než u žen.<sup>21,22</sup> U starších pacientů jsou koncentrace troponinu vyšší než u mladých. Předpokládá se, že to může být způsobeno přítomností komorbidit, která může negativně ovlivnit kardiomyocyty.<sup>23,24</sup> Kromě toho je koncentrace troponinu T ráno o něco vyšší než večer jak u zdravých pacientů,<sup>18,19,25</sup> tak u pacientů s renální nedostatečností.<sup>26</sup> Přesné mechanismy tvorby cirkadiálních rysů koncentrace srdečních troponinů nebyly stanoveny, lze však předpokládat, že je to způsobeno cirkadiálními rysy jiných lidských systémů, které do určité míry ovlivňují kardiovaskulární systém, zejména aktivaci sympatoadrenalinového a reninangiotenzinaldosteronového systému, zvýšení srdeční frekvence a krevního tlaku, a také aktivaci hemostatického systému. Tyto rysy se vyvinuly evolučně a jsou nezbytné pro zdravého člověka během bdění, mohou však mít další nepříznivý účinek v přítomnosti dalších rizikových faktorů (například aterosklerózy) a chronických kardiovaskulárních onemocnění (angina pectoris, tranzitorní ischemická ataka).<sup>27</sup> Stárí a cirkadiální rysy koncentrace srdečních troponinů nebyly dostatečně studovány a dostupné údaje o této problematice jsou protichůdné, a proto dosud nealezly uplatnění v rutinní praxi.

Hlavní biologickou tekutinou pro detekci hodnoty troponinů je krev. S příchodem vysoce citlivých metod však bylo možné stanovit troponiny v jiných biologických tekutinách, které lze získat neinvazivně, což je další důležitá a slibná výhoda. Získání tohoto biomateriálu od pacientů je atraumatické a bezbolestné, snižuje riziko vzniku infekcí (HIV, virová hepatitida atd.). Nevyžaduje vyškolený lékařský personál a biomateriál si může pacient odebrat sám doma. Například koncentrace troponinů v moči jsou poměrně nízké a nejsou zachyceny středně citlivými testovacími systémy, zatímco při použití vysoce citlivé metody výzkumu byl hs-TnT detekován v ranní moči všech subjektů a v moči pacientů s hypertenzí byly hodnoty hs-TnT významně vyšší než u pacientů s normálním krevním tlakem.<sup>28</sup> Sliny jsou dalším slibným neinvazivním biomateriálem pro diagnostiku mnoha endokrinních, onkologických a kardiovaskulárních onemocnění, včetně AIM.<sup>29,30</sup> V naší mnocentrické pilotní studii tedy bylo prokázáno, že koncentrace hs-cTnI ve slinách u pacientů s AIM je vý-

znamně vyšší než v kontrolní skupině pacientů a hodnoty hs-cTnI v krevním séru a slinách jsou mírně korelované.<sup>31</sup> Plánují se další studie na větších skupinách pacientů za účelem stanovení referenčních hodnot a standardizace preanalytické fáze ke zvýšení klinické a diagnostické hodnoty hs-cTnI ve slinách.

## Metody identifikace srdečních troponinů: krátká historie vývoje troponinových imunotestů

Identifikace troponinů v krvi se provádí řadou různých imunochemických metod (radioimunoanalýza, enzymový imunotest, imunofluorescence a imunochemiluminiscenční analýzy), jejichž hlavní princip zahrnuje několik po sobě jdoucích fází: imunologické, chemické, detekční. V první (imunologické) fázi dochází ke specifické interakci komerčních diagnostických protilátek s antigenem, kterým je v tomto případě troponin. Ve druhé a třetí fázi dochází buď k další imunologické reakci protilátek a tvorbě komplexu sendvičového typu, nebo k chemické (enzymatické) reakci a registraci přijatého signálu. Metody detekce signálu se také liší v závislosti na použitém štítku protilátky: v případě enzymového imunotestu se intenzita barvy hodnotí pomocí fotometru/spektrofotometru; v případě radioimunoanalýzy, kde se jako štítek používají radioizotopy (radionuklidy), se hodnotí radiometrem (rádiovým spektrometrem) a v případě použití fluoroforů se signál zaznamenává na fluorometru. Úroveň (síla) vyvinutého signálu je přímo úměrná koncentraci troponinů v biologickém vzorku. Výsledek je častěji vyjádřen v kvantitativních hodnotách (ng/ml, ng/l, µg/l) nebo se provádí vizuální posouzení počtu vytvořených proužků, což je charakteristické pro kvalitativní metody (diagnostické testovací proužky) používané u lůžka pacienta.

Vývoj metod imunitní analýzy pro detekci srdečních troponinů začal téměř před 35 lety a byl charakterizován postupným zlepšováním analytických parametrů a v důsledku toho i diagnostických možností. Úplně první metoda pro detekci srdečního troponinu I, která byla založena na radioimunoanalýze, byla vyvinuta v roce 1987. Měla detekční práh 10 µg/l (10 000 ng/l) a doba provedení byla poměrně dlouhá (1–2 dny). Kvůli tak nízké citlivosti a době trvání studie byla doba pro detekci diagnosticky významných koncentrací troponinu v krvi pozdní a tato metoda dokázala detekovat pouze rozsáhlé infarkty myokardu, proto byl troponin I významně nižší než v té době aktivně používaný enzym kreatinkináza-MB (CK-MB), který byl považován za „zlatý standard“ pro diagnostiku AIM.<sup>32</sup> O několik let později představil Katus a jeho kolegové první plně automatizovaný enzymový imunisorbentní test (ELISA) pro identifikaci troponinu T s detekčním limitem 100 ng/l a časem analýzy 90 minut. Maximální koncentrace troponinu T korelovaly s vrcholovými koncentracemi CK-MB. Tento imunotest, nazývaný také „test první generace“, byl lepší než standardní biomarkery používané v té době k diagnostice AIM.<sup>33</sup> Tato metoda však měla významnou nevýhodu, spočívající v křížové reakci diagnostických protilátek s izoformami troponinu charakteristickými pro kosterní svaly a vysokým procentem pozitivních výsledků při onemocněních

kosterních svalů (myopatie), těžké fyzické námaze (během maratonského běhu); nízká citlivost byla také považována za další nevýhodu. Metody druhé generace se vyznačovaly vyšší specificitou a senzitivitou, což se projevilo snížením zkřížené reaktivity s kosterními troponiny a možností dřívější diagnostiky AIM (v průměru 6–12 hodin po jejím vývoji). Měření hodnot troponinu u pacientů s AIM předčilo použití všech ostatních dostupných biomarkerů (CK-MB, laktátdehydrogenáza, aspartát-aminotransferáza) a v roce 2000 společný dokument Evropské kardiologické společnosti a American College of Cardiology doporučil použití troponinu T pro diagnostiku AIM.<sup>34</sup> Následné zdokonalení metod detekce a vývoj analýz „třetí“ a „čtvrté generace“ zcela eliminovaly zkříženou reaktivitu, zlepšily analytické vlastnosti včetně detekčního limitu (minimální detekovatelná koncentrace), doba analýzy se zkrátila přibližně o polovinu a převaha v diagnostice AIM konečně přešla od CK-MB na troponiny.<sup>35</sup> Za nevýhodu těchto mírně citlivých metod byla stále považována nízká citlivost a prodloužená průměrná doba potřebná pro přesnou laboratorní diagnostiku AIM (detekce diagnosticky významných hodnot srdečních troponinů v krvi), činila 6–12 hodin od okamžiku vývoje klinického obrazu AIM. V letech 2007–2009 se objevily první zprávy o vysoce citlivých analytických metodách („páté generace“), jejichž detekční prahová hodnota činí 1–10 ng/l, což jsou přibližně desetkrát a stokrát vyšší hodnoty než u mírně citlivých metod a tisíckrát vyšší hodnoty než u prototypů před 30 lety, a doba analýzy činí 20–30 minut.<sup>36–38</sup>

Imunotesty troponinu I prošly podobným vývojem od prvního prototypu vyvinutého Cumminsem (1987). V roce 1992 byly k vývoji enzymově vázaného imunisorbentního testu použity monoklonální protilátky: detekční limit byl 1 900 ng/l a doba provedení studie činila 3,5 hodiny. Na rozdíl od tehdy existujících metod pro identifikaci troponinu T byla tato analýza vysoce specifická pro detekci poškození myokardu. A falešně pozitivní výsledky nebyly prakticky pozorovány ani za podmínek onemocnění kosterního svalstva (myopatie), chronického selhání ledvin a maratonského běhu.<sup>32,39</sup> Za posledních 25 let vědci a výrobci vyvinuli několik testů s různými kombinacemi protilátek na různých platformách. V současné době je na trhu více než 30 testovacích systémů pro detekci troponinu I. Dostupné metody sahají od starších, méně citlivých modelů po moderní, vysoce citlivé a ultracitlivé. Kvůli heterogenitě metod analýzy cTnI se kvantitativní výsledky získané u stejného pacienta pomocí různých metod a na různých analyzátoch (zařízeních) neshodují. Standardizace metod detekce cTnI na základě různých platformů zůstává obtížným úkolem a je jedním z hlavních problémů.<sup>40</sup> Pokud je tedy nutné převézt pacienta do jiné nemocnice, která používá jiný testovací systém, nelze výsledky identifikace troponinu srovnávat, což je doprovázeno dalšími ekonomickými a časovými náklady.

Mezi nejoblíbenější patří podle Mezinárodní federace klinické chemie (IFCC) testovací sady komerčně dostupné pro provádění vysoce citlivých analýz od následujících společností: Abbot, Beckman Coulter, bioMerieux, LSI Medicine, Roche, Ortho, Siemens, Singulex atd.<sup>41</sup>

Z nich soupravy pro identifikaci hs-TnT vyrábí pouze společnost Roche, všechny ostatní vyrábějí soupravy pro

hs-TnI. Velkou nevýhodou těchto testů je nedostatečná standardizace, která je vyjádřena v různých výsledcích u stejného pacienta, pokud jsou určeny různými komerčními soupravami, a výsledky se mohou lišit pětikrát až desetkrát nebo více. To je primárně způsobeno skutečností, že různé soupravy používají různé protilátky zaměřené na různé epitopy (antigenní determinanty) molekul troponinů: při AIM cirkulují v krvi ve větší míře fragmenty troponinů s odlišnou stabilitou. Použití protilátek namířených proti nestabilním troponinovým epitopům tedy povede k podcenění výsledků ve srovnání s protilátkami proti stabilním oblastem molekuly. Současné jsou některé epitopy molekul troponinů terčem autoprotilátek a heterofilních protilátek, zatímco ty mohou přispívat k produkci falešně pozitivních i falešně negativních výsledků. V tomto směru další výzkum pokračuje v objasňování mechanismů vlivu na výsledek analýzy (interference), což přispěje ke zlepšení kvality a standardizace analýz.

Mnoho zdravotnických zařízení dosud přešlo na používání vysoce citlivých testovacích systémů na troponin. Anand a spol. nedávno provedli globální studii s cílem posoudit implementaci klíčových doporučení Univerzální definice infarktu myokardu (2018) týkajících se používání vysoce citlivých troponinů pomocí telefonního dotazníku ve speciálně navržené formě. Autoři provedli rozhovory s lékaři v 1 902 lékařských centrech ve 23 zemích na 5 kontinentech. Srdeční troponin byl použit jako hlavní marker pro diagnostiku AIM v 96 % center; užívání CK-MB pokračuje v některých zemích Latinské Ameriky (Argentina, Mexiko). Pouze 41 % středisek použilo vysoce citlivé testy, přičemž široký rozsah byl od 7 % v Severní Americe po 60 % v Evropě. V institucích, které používaly vysoce citlivé metody analýzy, se častěji používala strategie sériového měření s převahou zrychlených diagnostických drah (0–3

h), častěji se brala v úvahu diagnostická prahová hodnota 99. percentilu, avšak pouze 18 % center používalo prahové hodnoty 99. percentilu, spojené s genderovými charakteristikami.<sup>42</sup>

### Vysoce citlivé metody pro detekci troponinů: analytické vlastnosti, kritéria, klasifikace

Hlavní analytické charakteristiky kvality troponinových imunotestů jsou: limit měření parametrů kontrolního vzorku (LoB) – maximální koncentrace analytu, kterou lze detekovat ve vzorku, který jej neobsahuje, limit detekce (LoD) – minimální detekovatelná koncentrace, limit kvantitativní identifikace (funkční citlivost, LoQ), 99. percentil, genderové charakteristiky 99. percentilu, procento měřitelných hodnot u zdravých jedinců, variační koeficient (% CV), poměr 99. percentilu / LoD.<sup>20,43,44</sup>

Mnoho vědců má otázku: která analýza by měla být považována za vysoce citlivou? Pracovní skupina IFCC Výboru pro klinické použití srdečních biomarkerů (TF-CB IFCC) navrhla určovat metodu jako vysoce citlivou, pokud splňuje dvě kritéria.<sup>20</sup> Nejprve by % CV při stanovení hodnot 99. percentilu neměla překročit 10 %. Za druhé u více než 50 % zdravých lidí by měla být koncentrace troponinů vyšší než LoD analytické metody.

Mnoho metod označených jako vysoce citlivé však tato kritéria nesplňuje. U hs-analýz by všechny časopisy, výrobci, laboratoře a instituce měly používat jednotku měření ng/l, aby nedocházelo k nejasnostem a desetinným čárkám, za kterými následují zbytečné nuly, používané ve středně citlivých a některých moderních vysoce citlivých analýzách.<sup>20</sup>

**Tabulka 1 – Moderní analytické charakteristiky kvality srdečních troponinových imunotestů**

Parametr	Popis, komentář
LoB (Limit of Blank) – Limit měření parametrů kontrolního vzorku (falešné spouštění)	Nejnižší signál generovaný v kapalině s nulovou koncentrací troponinů (varianta naprázdno) – čím méně, tím lépe
LoD (Limit of Detection) – detekční limit (minimální detekovatelná koncentrace)	Hodnota získaná v biologické tekutině s nejnižší koncentrací troponinu – čím méně, tím lépe
LoQ (Limit of Quantitation) – limit kvantitativní detekce (funkční citlivost)	Minimální koncentrace, kterou lze určit s odchylkou ≤ 10% – čím méně, tím lépe
Celková hodnota (bez ohledu na pohlaví) 99. percentil	Koncentrace troponinu zjištěná u 99 % skutečně zdravých jedinců a pouze u 1 % skutečně zdravých zkoumaných lidí jsou falešně pozitivní výsledky přípustné nejčastěji z nějakého neznámého důvodu
Genderové hodnoty 99. percentilu	Koncentrace troponinů detekované u 99 % zdravých jedinců, s přihlédnutím k pohlaví. U mužů je 99. percentil horní hranice normy přibližně 1,5- až 2krát vyšší než u žen, v závislosti na použité analýze
Prahová hodnota (hraniční hodnota)	Minimální koncentrace troponinu pro stanovení diagnózy AIM. Tento ukazatel se používá pouze ve středně citlivých testovacích systémech, zatímco v zrychlených algoritmech využívajících vysoce a ultracitlivé testovací systémy se jako referenční úroveň používá úroveň 99. percentilu.
Variační koeficient (% CV)	Náhodný rozptyl měření ve stejném vzorku. Čím menší je, tím přesnější je analýza.
Procento hodnot < 99. percentil u zdravých subjektů	Počet zdravých lidí (v %), u kterých je hodnota troponinu v krvi detekována v rozmezí od LoD do 99. percentilu.
Poměr 99. percentil/LoD	Čím více, tím vyšší je citlivost testu



Klinická a diagnostická hodnota výsledků identifikace hs-TnT a hs-TnI přímo souvisí s analytickými charakteristikami použitých troponinových diagnostik (tabulka 1). Při stanovení analytických parametrů testovacího systému je třeba dodržovat doporučení odborníků IFCC. Například pro stanovení hodnot 99. percentilu podle pohlaví je nutné detekovat troponiny u nejméně 300 žen a 300 mužů. V budoucnu je lze upravit při příjmu nových údajů a v ideálním případě by každá laboratoř měla stanovit vlastní 99. percentil, který v tomto případě bude odpovídat nejen použitému testovacímu systému a analyzátoru, ale také charakteristikám této populace. Vzhledem ke složitosti a nákladům na takové studie je však možné zaměřit se na parametry poskytované výrobcem.<sup>20,44</sup> Stanovení optimálních hodnot pro 99. percentil je velmi důležitým momentem a zahrnuje řadu klíčových otázek: jak by měly být vybrány referenční skupiny? Která metoda statistického výpočtu by měla být použita? Definice toho, co znamená zdravý člověk, je předmětem debaty.<sup>20</sup> Jak by měli být pacienti vybíráni podle věku – mladí (< 30 let) nebo ti, kteří odpovídají klasickým pacientům s AIM (40–90 let)? Jaká kritéria by měla být použita pro označení „zdravých“ pacientů – pomocí jednoduchého průzkumu (dotazníku) nebo pomocí kompletního lékařského vyšetření, včetně fyzikálních i instrumentálních laboratorních studií (elektrokardiografie, echokardiografie, stanovení koncentrace natriuretických peptidů, koncentrace kreatininu)? Druhá možnost je ideální, ale drahá. Výběr kontrolní skupiny podle přísných kritérií posune 99. percentil na nižší hodnoty.<sup>45</sup> Při výpočtu 99. percentilu je navíc zapotřebí jednotný statistický přístup. Navrhované metody výpočtu – neparametrická metoda (metoda podle Harrell a Davise) a robustní (stabilní) statistická metoda poskytují různé hodnoty 99. percentilu. O tomto skóre pokračují diskuse.<sup>46</sup> Výše uvedené podmínky tedy mají velký vliv na stanovení úrovně 99. percentilu, což je jedno z vysvětlení jeho významné variabilnosti mezi analytickými metodami od různých výrobců.

Některé nové rychlé diagnostické algoritmy (jednohodinové a dvouhodinové) zároveň necílí na úroveň 99. percentilu jako referenční diagnostickou prahovou hod-

notu, ale používají nižší mezní hodnoty pro rozhodování o hospitalizaci/invazivních zásazích nebo o odeslání pacienta domů. Je to proto, že mnoho pacientů s koncentracemi hs-Tn v rozmezí od LoD (nebo LoQ) do 99. percentilu má vyšší riziko nežádoucích výsledků ve srovnání s pacienty s minimálními nebo žádnými detekovatelnými hodnotami (tj. < LoD nebo LoQ). Úspěch těchto strategií byl prokázán v řadě studií k rychlému vyloučení akutního koronárního syndromu a identifikaci pacientů se zvýšeným rizikem 30denních nežádoucích kardiovaskulárních příhod.<sup>47–52</sup>

LoD je velmi důležitý při včasné diagnostice AIM. Například imunoanalytická metoda první a druhé generace měla LoD v rozmezí 100–500 ng/l, díky čemuž byl AIM diagnostikován příliš pozdě (po 12–24 hodinách), v řadě případů malohniskové infarkty nebyly diagnostikovány a troponin nebyl detekován u žádného zdravého pacienta (0 % naměřených hodnot v referenční populaci). V současné fázi vývoje vysoce citlivých analýz může být LoD jen několik ng/l, a dokonce i < 1 ng/l, což je stokrát citlivější a umožňuje detekovat poškození myokardu na úrovni jednotlivých buněk; procento naměřených hodnot troponinů se pohybuje od 50 do 100 %.<sup>17,41</sup> Garcia-Osuna a spol. nedávno studovali analytické vlastnosti nové metody detekce troponinu I na úrovni jednotlivých molekul. Studie ukázala, že tato metoda je přibližně 10krát citlivější než v současné době používaná metoda hs-Tn I. LoD této metody byla 0,08–0,12 ng/l a podíl zdravých lidí s měřitelnými koncentracemi troponinu dosáhl 99,5 %. Současně byly velmi přísně vybírány zdravé subjekty (na základě historie, normálních hodnot natriuretických peptidů a kreatininu). Medián hs-cTnI byl významně vyšší u mužů ve srovnání se ženami a u starších osob ve srovnání s mladými lidmi, což naznačuje potřebu odrážet věkové charakteristiky v hodnotách hs-cTnI. Tento hypersenzitivní imunotest je významně lepší než jiné stávající vysoce citlivé metody.<sup>53</sup> Této citlivosti bylo dosaženo použitím 4 typů protilátek: 2 z nich jsou zaměřeny na epitopy umístěné ve středu troponinu a 2 na epitopy umístěné na obou koncích molekuly, který poskytuje větší absorpci molekuly troponinu I a jeho fragmentů ve srovnání s testovacími systémy založenými na použití 2–3 typů protilátek.

Důležitým parametrem, který určuje přesnost imunotestu, je % CV. Metoda je považována za vysoce přesnou a splňuje požadavky IFCC, pokud při sériové detekci hodnoty troponinu ve stejném vzorku nepřekročí průměrné rozpětí získaných výsledků 10 % (CV ≤ 10%). Avšak vzhledem k nízké komerční dostupnosti vysoce přesných testů jsou v mnoha laboratořích stále široce používány troponinové testy s 10 % ≤ CV ≤ 20 %. Použití těchto testovacích systémů může vést k falešně pozitivním a falešně negativním výsledkům. Testy s CV > 20 % jsou pro klinické použití nepřijatelné a měly by být vyloučeny (tabulka 2). Významné zlepšení analytických parametrů vysoce citlivých testů umožnilo zavést další, takzvanou „funkční“ klasifikaci metod založenou na poměru 99. percentilu a LoD. Čím vyšší je poměr 99. percentilu / LoD, tím vyšší je pravděpodobnost identifikace subjektů s měřitelnými hodnotami.

Některé stávající moderní vysoce citlivé testovací systémy dostupné pro klinické použití a jejich analytické

**Tabulka 2 – Přesnost a citlivost metod imunotestu srdečních troponinů**

Variační koeficient (nepřesnost analýzy v %)	
CV ≤ 10	Vysoká přesnost (přijatelná pro diagnostiku)
10 ≤ CV ≤ 20	Nízká přesnost, ale klinicky přijatelná
CV ≥ 20	Nepřijatelné pro použití
Procento (%) měřitelných hodnot < 99. percentil u zdravých lidí	
< 50	Středně citlivé – 1. úroveň
50–75	Vysoce citlivé 1. generace – 2. úroveň
75–95	Vysoce citlivé 2. generace – 3. úroveň
> 95	Vysoce citlivé 3. generace – 4. úroveň
99–100	Vysoce citlivé 4. generace – 5. úroveň
Poměr mezi 99. percentilem a LoD	
< 1	Klinicky přijatelné (vysoká citlivost)
≥ 10	Extremně vysoce citlivý
≥ 20	Ultrasensitivní

**Tabulka 3 – Vysoce citlivé metody pro detekci srdečních troponinů T a I podle údajů Výboru pro klinické použití srdečních biomarkerů IFCC (od prosince 2019, poskytované výrobci) podle<sup>54</sup> se změnami**

Společnost/platforma/metoda	LoB (ng/l)	LoD (ng/l)	CV (%)	99percentilní (obecný a dle genderových rysů), ng/l	Procento měřitelných hodnot v rozmezí od LoD do 99. percentilu (obecné a dle genderových rysů, %)	Statistická metoda použitá k výpočtu 99. percentilu
Abbott/Alinity i systems/Alinity i STAT High Sensitive Troponin-I; commercial OUS	1,0	1,6	4,0 %	Obecný – 26,2 Ж – 15–6 M – 34,2	Obecný – 85 % Ж – 78 % M – 92 %	Robust. statistika
Abbott/ARCHITECT i systems/ARCHITECT STAT High Sensitive Troponin-I; commercial	0,7–1,3	1,1	4,0 %	Obecný 26,2 Ж – 15,6 M – 34,2	Obecný – 85 % Ж – 78 % M – 92 %	Robust. statistika
Beckman Coulter/Access 2, Dxl/Access hsTnI; commercial – OUS	0,0–1,	1,0–2,3	3,7	Obecný – 17,5 Ж – 11,6 M – 19,8	> 50	Neparametrický
Beckman Coulter/Access 2, /Access hs TnI; commercial – U.S.: Serum	0,0–0,8	1,0–2,0	6,0	Obecný – 18,2 Ж – 11,8 M – 19,7	> 50	Neparametrický
LSI Medience (formerly Mitsubishi) PATHFAST hs-cTnI; commercial	–	1	< 6	Obecný – 15,48 Ж – 16,91 M – 11,46	Obecný – 76	Neparametrický
LSI Medience (former Mitsubishi) PATHFAST hs-cTnI /PATHFAST cTnI-II	1,23	2,33	6,1	Obecný – 27,9 Ж – 20,3 M – 29,7	Obecný – 66,3 Ж – 52,8 M – 78,8	Neparametrický
Ortho/VITROS/hs Troponin I; commercial	0,14–0,51	0,39–0,86	< 10	Obecný – 11,0 Ж – 9,0 M – 12,0	> 50	Neparametrický
Roche/cobas e801/cTnT-hs 18-min and STAT; commercial	2,5	3	< 10	Obecný – 14,0 Ж – 9,0 M – 16,0	Obecný – 57,4	Neposkytnuto výrobcem
Siemens ADVIA Centaur XP/ XPT High Sensitivity TnI (TNIH), US & OUS; commercial	0,50	1,6	< 4,9	Obecný – 46,5 Ж – 39,6 M – 58,0	Obecný – 72,0 Ж – 57,0 M – 86,0	Neparametrický
Singulex Clarity cTnI; commercial	0,02	0,08	2,39	Obecný – 8,67 Ж – 8,76 M – 9,23	Obecný – 99 Ж – 99 M – 100	Neparametrický

parametry jsou shrnuty v tabulce 3 (podle IFCC, prosinec 2019).<sup>54</sup>

## Závěr

Vysoce citlivé metody pro detekci troponinů významně změnily naše chápání biologie srdečních troponinů a umožnily zlepšit diagnostiku AIM. Řada problémů spojených s analýzou však může ovlivnit účinnost detekce srdečních troponinů v běžné klinické praxi. Pro spolehlivé a optimální použití vysoce citlivých metod pro detekci troponinů v klinické praxi je důležité vzít v úvahu jejich hlavní analytické charakteristiky: 99. percentil, genderové charakteristiky 99. percentilu, detekční limit (minimální detekovatelná koncentrace), variační koeficient, 99. percentil / detekční limit, limit měření parametrů kontrolního vzorku. Vzhledem k tomu, že stále více výrobců vyrábí testovací systémy, založené na vysoce citlivých detekčních metodách, je nutné provádět nezávislé analytické a klinické hodnocení těchto metod.

## Prohlášení autora o možném střetu zájmů

Autor vylučuje střet zájmů.

## Financování

Vznik článku nebyl finančně podporován žádným privátním ani akademickým subjektem.

## Literatura

1. Park KC, Gaze DC, Collinson PO, Marber MS. Cardiac troponins: from myocardial infarction to chronic disease. *Cardiovasc Res* 2017;113:1708–1718.
2. Pasquale F, Syrris P, Kaski JP, et al. Long-term outcomes in hypertrophic cardiomyopathy caused by mutations in the cardiac troponin T gene. *Circ Cardiovasc Genet* 2012; 5:10–17.
3. Messner B, Baum H, Fischer P, et al. Expression of messenger RNA of the cardiac isoforms of troponin T and I in myopathic skeletal muscle. *Am J Clin Pathol* 2000;114:544–549.
4. Ricchiutti V, Apple FS. RNA expression of cardiac troponin T isoforms in diseased human skeletal muscle. *Clin Chem* 1999;45:2129–2135.

5. Wens SCA, Schaaf GJ, Michels M, et al. Elevated plasma cardiac troponin T levels caused by skeletal muscle damage in Pompe disease. *Circ Cardiovasc Genet* 2016;9:6–13.
6. Schmid J, Liesinger L, Birner-Gruenberger R, et al. Elevated cardiac troponin T in patients with skeletal myopathies. *J Am Coll Cardiol* 2018;71:1540–1549.
7. Rusakov DY, Vologdina NN, Tulayeva ON. The development of striated cardiac muscle tissue in the walls of the caval and pulmonary veins. *Journal of Anatomy and Histopathology* 2015;4:105. (In Russian).
8. Dhoot GK, Gell PG, Perry SV. The localization of the different forms of troponin I in skeletal and cardiac muscle cells. *Exp Cell Res* 1978;117:357–370.
9. Dhoot GK, Perry SV. Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. *Nature* 1979;278:714–718.
10. Filatov VL, Katruha AG, Bulargina TV. et al. Troponin: structure, properties and mechanism of functioning. *Biochemistry* 1999;64:1155–1174. (In Russ.).
11. Velkov VV. The new international criteria of cardiac infarction and highly sensitive troponins: new possibilities and new problems. *Klin Lab Diagn* 2014;59:43–53. (In Russ.).
12. Ni L, Wehrens XHT. Cardiac troponin I-more than a biomarker for myocardial ischemia? *Ann Transl Med* 2018;6:S17.
13. Chaulin AM, Duplyakov DV. MicroRNAs in Atrial Fibrillation: Pathophysiological Aspects and Potential Biomarkers. *Int J Biomed* 2020;10:198–205.
14. Chaulin AM, Abashina OE, Duplyakov DV. Pathophysiological mechanisms of cardiotoxicity in chemotherapeutic agents. *Russian Open Medical Journal* 2020;9: e0305.
15. Wilhelm J, Hettwer S, Schuermann M, et al. Elevated troponin in septic patients in the emergency department: frequency, causes, and prognostic implications. *Clin Res Cardiol* 2014;103:561–567.
16. Dubin RF, Li Y, He J, et al. Predictors of high sensitivity cardiac troponin T in chronic kidney disease patients: a cross-sectional study in the chronic renal insufficiency cohort (CRIC). *BMC Nephrol* 2013;14:229.
17. Zumrutdal AO, Bakinen O, Ucan H, et al. Relationship between uremic myopathy and false-positive cardiac troponin T test. *Nephron* 2000;86:522–523.
18. Klinkenberg LJJ, Wildi K, van der Linden N, et al. Diurnal rhythm of cardiac troponin: consequences for the diagnosis of acute myocardial infarction. *Clin Chem* 2016;62:1602–1611.
19. Chaulin AM, Duplyakova PD, Duplyakov DV. Circadian rhythms of cardiac troponins: mechanisms and clinical significance. *Russian Journal of Cardiology* 2020;25:4061. (In Russ.).
20. Apple FS, Jaffe AS, Collinson P, et al. IFCC educational materials on selected analytical and clinical applications of high sensitivity cardiac troponin assays. *Clin Biochem* 2015;48:201–203.
21. Shah A, Griffiths M, Lee KK, et al. High sensitivity cardiac troponin and the under-diagnosis of myocardial infarction in women. *BMJ* 2015;350:g7873.
22. Gore MO, Seliger SL, deFilippi CR, et al. Age- and sex-dependent upper reference limits for the high-sensitivity cardiac troponin T assay. *J Am Coll Cardiol* 2014;63:1441–1448.
23. Trupp RJ, Albert G, Ziegler A. Sex-specific 99th percentiles derived from the AACC Universal Sample Bank for the Roche Gen 5 cTnT assay: Comorbidities and statistical methods influence derivation of reference limits. *Clin Biochem* 2018;52:173.
24. Venge P, Lindahl B. Cardiac troponin assay classification by both clinical and analytical performance characteristics: a study on outcome prediction. *Clin Chem* 2013;59:976–981.
25. Aakre KM, Roraas T, Petersen PH, et al. Weekly and 90-minute biological variations in cardiac troponin T and cardiac troponin I in hemodialysis patients and healthy controls. *Clin Chem* 2014;60:838–847.
26. van der Linden N, Cornelis T, Klinkenberg LJJ, et al. Strong diurnal rhythm of troponin T, but not troponin I, in a patient with renal dysfunction. *Int J Cardiol* 2016;221:287–288.
27. Zenina OYu, Makarova II, Ignatova YuP, et al. Chronophysiology and Chronopathology of Cardiovascular System (Literature Review). *Ekologiya cheloveka [Human Ecology]*. 2016;1:25–33. (In Russ.).
28. Pervan P, Svaguša T, Prkačin I, et al. Urine high sensitive Troponin I measuring in patients with hypertension. *Signa Vitae – A Journal In Intensive Care And Emergency Medicine* 2017;13(Suppl. 3):62–64.
29. Chaulin AM, Karslyan LS, Grigoriyeva EV, et al. Clinical and Diagnostic Value of Cardiac Markers in Human Biological Fluids. *Kardiologiya* 2019;59:66–75. (In Russ.).
30. Mirzaei-Dizgah I, Riahi E. Salivary high-sensitivity cardiac troponin T levels in patients with acute myocardial infarction. *Oral Diseases* 2013;19:180–184.
31. Chaulin AM, Duplyakova PD, Bikbaeva GR, et al. Concentration of high-sensitivity cardiac troponin I in the oral fluid in patients with acute myocardial infarction: a pilot study. *Russian Journal of Cardiology* 2020;25:3814. (In Russ.).
32. Cummins B, Auckland ML, Cummins P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1987;113(6):1333-1344. doi:10.1016/0002-8703(87)90645-4.
33. Katus HA, Looser S, Hallermayer K, et al. Development and in vitro characterization of a new immunoassay of cardiac troponin T. *Clin Chem* 1992;38:386–393.
34. Alpert JS, Thygesen K, Antman E, et al. Myocardial infarction redefined – a consensus document of The Joint European Society of Cardiology/American College of Cardiology Committee for the redefinition of myocardial infarction [published correction appears in *J Am Coll Cardiol* 2001;37(3):973]. *J Am Coll Cardiol* 2000;36:959–969.
35. Hermesen D, Apple F, Garcia-Beltrán L, et al. Results from a multicenter evaluation of the 4th generation Elecsys Troponin T assay. *Clin Lab* 2007;53:1–9.
36. Reichlin T, Hochholzer W, Stelzig C, et al. Incremental value of copeptin for rapid rule out of acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2009;54:60–68.
37. Mingels A, Jacobs L, Michielsen E, et al. Reference population and marathon runner sera assessed by highly sensitive cardiac troponin T and commercial cardiac troponin T and I assays. *Clin Chem* 2009;55:101–108.
38. Keller T, Zeller T, Ojeda F, et al. Serial changes in highly sensitive troponin I assay and early diagnosis of myocardial infarction. *JAMA* 2011;306:2684–2693.
39. Adams JE 3rd, Bodor GS, Dávila-Román VG, et al. Cardiac troponin I. A marker with high specificity for cardiac injury. *Circulation* 1993;88:101–106.
40. Apple FS. Counterpoint: Standardization of cardiac troponin I assays will not occur in my lifetime. *Clin Chem* 2012;58:169–171.
41. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine: Task Force on Clinical Applications of Cardiac Bio-Markers. Analytical Characteristics of Commercial Cardiac Troponin I and T Assays Declared by the Manufacturer. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. <http://www.ifcc.org/media/477275/ifccenewsmay2018.pdf>.
42. Anand A, Shah ASV, Beshiri A, et al. Global Adoption of High-Sensitivity Cardiac Troponins and the Universal Definition of Myocardial Infarction. *Clin Chem* 2019;65:484–489.
43. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev* 2008;29(Suppl 1):S49–S52.
44. Apple FS. A new season for cardiac troponin assays: it's time to keep a scorecard. *Clin Chem* 2009;55:1303–1306.
45. Collinson PO, Heung YM, Gaze D, et al. Influence of population selection on the 99th percentile reference value for cardiac troponin assays. *Clin Chem* 2012;58:219–225.
46. Eggers KM, Apple FS, Lind L, et al. The applied statistical approach highly influences the 99th percentile of cardiac troponin I. *Clin Biochem* 2016;49:1109–1112.
47. Cervellin G, Mattiuzzi C, Bovo C, et al. Diagnostic algorithms for acute coronary syndrome – is one better than another? *Ann Transl Med* 2016;4:193.

48. Sørensen NA, Neumann JT, Ojeda F, et al. Challenging the 99th percentile: A lower troponin cutoff leads to low mortality of chest pain patients. *Int J Cardiol* 2017;232:289–293.
49. Lippi G, Bonfanti L, Dipalo M, et al. Clinical, organizational and economic analysis of high-sensitivity cardiac troponin testing in the emergency department. *Ann Res Hosp* 2017;1:44.
50. Pickering JW, Than MP, Cullen L, et al. Rapid Rule-out of Acute Myocardial Infarction With a Single High-Sensitivity Cardiac Troponin T Measurement Below the Limit of Detection: A Collaborative Meta-analysis [published correction appears in *Ann Intern Med* 2017;167:528]. *Ann Intern Med* 2017;166:715–724.
51. Ferencik M, Mayrhofer T, Lu MT, et al. High-sensitivity cardiac troponin I as a gatekeeper for coronary computed tomography angiography and stress testing in patients with acute chest pain. *Clin Chem* 2017;63:1724–1733.
52. Jaeger C, Wildi K, Twerenbold R, et al. One-hour rule-in and rule-out of acute myocardial infarction using high-sensitivity cardiac troponin I. *Am Heart J* 2016;171:92–102.e1025.
53. Garcia-Osuna A, Gaze D, Grau-Agramunt M, et al. Ultrasensitive quantification of cardiac troponin I by a Single Molecule Counting method: analytical validation and biological features. *Clin Chim Acta* 2018;486:224–231.
54. <https://www.ifcc.org/media/478231/high-sensitivity-cardiac-troponin-i-and-t-assay-analytical-characteristics-designated-by-manufacturer-v122019.pdf>.